



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/31, 1/20, 1/21, C12P 21/02 // (C12N 15/31, C12R 1:385) (C12N 15/31, C12R 1:01) (C12N 1/20, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/37202 (43) 国際公開日 1998年8月27日(27.08.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00734 (22) 国際出願日 1998年2月24日(24.02.98) (30) 優先権データ 60/039,449 1997年2月24日(24.02.97) US (71) 出願人; および (72) 発明者 梶 昭(KAJI, Akira)[JP/JP] 〒203-0011 東京都東久留米市大門町1丁目1番9号 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 葛和清司, 外(KUZUWA, Kiyoshi et al.) 〒102-0083 東京都千代田区麹町3丁目2番地 相互麹町第一ビル 葛和国际特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: ISOLATION OF RIBOSOME RECYCLING FACTOR GENES AND DETERMINATION OF THE PRIMARY STRUCTURES OF RIBOSOME RECYCLING FACTOR GENES OF <i>PSEUDOMANAS AERUGINOSA</i> AND ONE OTHER (54)発明の名称 リボソームリサイクリング因子遺伝子の単離及び緑膿菌ほか1種のリボソームリサイクリング因子の一次構造 (57) Abstract In the rational drug design for developing new microbial agents of the next generation targeting ribosome recycling factors (RRFs), RRFs are highly expressed by using temperature sensitive gene variants of <i>Escherichia coli</i> carrying plasmids having genes (fir) encoding RRFs of various bacteria, thus clarifying both the primary and the three-dimensional structures of RRFs and firs of various bacteria on the molecular level.</p>		

(57) 要約

RRFをターゲットとしたラショナルドラッグデザインによる、次世代抗菌剤の開発にあたり、各種細菌のリボソームリサイクリング因子(RRF)をコードしている遺伝子(frr)を組み込んだプラスミドを有する大腸菌の温度感受性遺伝子変異株を用いてRRFを高発現させ、もって各種細菌のRRF及びfrrの分子レベルにおける一次構造、三次元構造の解明に資する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チャード
AU	オーストラリア	GB	英国	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GN	ギニア			TT	トリニダード・トバゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	US	米国
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ウイエトナム
CA	カナダ	IL	イスラエル	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NO	ノルウェー		
CH	スイス	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CI	コートジボアール	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KR	韓国	PT	ポルトガル		
CN	中国	KG	キルギス	RO	ルーマニア		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
CY	キプロス	LA	ラオス	SD	スーダン		
CZ	チェコ	LC	セント・ルシア	SE	スウェーデン		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
DK	デンマーク	LR	リベリア	SI	スロベニア		
EE	エストニア	LS	レソト	SK	スロバキア		
ES	スペイン			SL	シエラ・レオネ		

明 細 書

リボソームリサイクリング因子遺伝子の単離及び緑膿菌ほか1種のリボソームリサイクリング因子の一次構造

技術分野

本発明は、RRFをターゲットとしたラショナルドラッグデザインによる、次世代抗菌剤を開発する技術に関する。より具体的には、該開発に有用な大腸菌の温度感受性遺伝子変異株、各種細菌のリボソームリサイクリング因子(RRF)をコードしている遺伝子(frr)を組み込んだプラスミドを有する大腸菌の温度感受性遺伝子変異株、及びこれを用いたRRF及びfrrの同定に関する。さらに本発明は、RRFを高発現させる方法、及びRRFの精製方法に関する。本発明はまた、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) RRF、未確認菌株X RRFの各アミノ酸配列及び緑膿菌frr、X frrの各塩基配列に関する。

背景技術

蛋白質生合成は、すべての細胞の生命活動において必要不可欠な機能であり、「開始」、「伸展」、「終結」及び「リボソームリサイクリング」の4段階から成り立っている。蛋白質生合成における最終的なステップ(第4ステップ)は、次の「開始」段階へリボソームを再利用するために、メッセンジャーRNA、転移RNA、リボソームからなる終結複合体を各々遊離、解離させることにより終了する。大腸菌においては、このリボソームの「再利用」はリボソームリサイクリング因子(Ribosome recycling factor, 以下RRFという)とエロンゲーション因子G(elongation factor G, 以下EFG)により触媒されることが分かっている。このリボソーム「再利用」の過程はJanosi博士らによる総説(1996 Adv. Biophys. 32: 121 - 201)において紹介されている。

一方、近年、従来の抗生物質への耐性獲得菌株が数多く報告されてきており、細菌の発育を直接的に制限し得る部位を標的とする、新たな抗生物質の開発が早急に必要とされている。

解決しようとする課題

本発明者は、RRFをその標的とする新しい抗生物質の開発が極めて有用である

点に着目し、先に発明を完成し特許出願をなした（特願平10-14747号）。また本発明者はRRFをターゲットとする抗菌剤をラショナルドラッグデザイン法で創造するため、さらに鋭意研究を重ねてきた。

これまでに得られてきた蛋白質翻訳終結複合体の解離に関する結果はすべて、原核生物での研究が中心となっている。真核生物においてRRFに相当する遺伝子の重要な報告はいまだなされていない理由の一つは、この蛋白合成における最終段階の仕組みが、以下のとおり原核生物のそれと異なることによる。

第一に、真核生物におけるRRF様の機能蛋白はミトコンドリアやクロロプラストに限られることが挙げられる。周知の如く、ミトコンドリアやクロロプラストは遺伝学的に細菌から起源していることがわかっているので、RRFが特に細菌に重要であることがこのことからうかがえる。

第二に、海底火山菌の *M. jannaschii* はその蛋白質生合成に関する因子のホモロジーが真核生物のそれぞれの因子と非常に高いことが知られているが（Bultら 1996, *Science*, 273: 1058-1073）、RRF 相当の蛋白は見られない。この細菌は蛋白合成系が真核生物と非常に似通っているにも拘わらず、ミトコンドリアやクロロプラストにあたるオルガネルが存在しない。このことは、この細菌や真核生物において蛋白質翻訳終結複合体の解離はRRFではない他の因子により触媒される可能性を示唆している。

第三に、真核生物の mRNA はモノシストロニックで原核生物のそれはポリシストロニックであることが挙げられる（Kozak 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7: 3438-3445; Dasら 1984, *Nucleic Acids Res.* 12: 4757-4768; Schonerら 1986 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 8506-8510; Sprengelら 1985 *Nucleic Acids Res.* 13: 893-909）。

このように真核生物における蛋白質生合成の最終段階にあたる蛋白質翻訳終結複合体の解離という第4段階が原核生物のものと異なるので、RRFは新しい型の抗生物質の良きターゲットといえる。これらの考察から分かるように、RRFをターゲットとした抗菌剤の開発は、産業上極めて意義深いものである。

ところで、これまでのRRFの研究はほとんどすべて大腸菌を用いて行なわれてきた。frrは大腸菌にとって必要不可欠な遺伝子であり、また広く細菌間でホモロ

ジーが高いという事実から、この因子の生物学的な重要性の高さが強く示唆される。そして本発明者は、既到大腸菌の RRF 及び *frr* の同定に成功している（特開平 3 - 200797 号公報）。しかしながら、RRF が抗菌剤の絶好のターゲットであることは前記のとおり明らかであるから、各種菌株の *frr* 遺伝子とその遺伝子のコードする RRF の分子レベルにおける構造解析、三次元構造解析を進めることは、ラショナルドラッグデザインで RRF 阻害剤を創造し、次世代抗菌剤を開発する上で極めて重要な課題である。

発明の開示

本発明はこのような課題を解決するためになされたものであり、緑膿菌などの菌株の RRF をコードしている遺伝子とアミノ酸配列の同定において、大腸菌の温度感受性遺伝子変異株を使用するという新規な技術思想に基づいている。

先に本発明者は、温度感受性 RRF 変性遺伝子 *frr* を有するプラスミドの作成に成功した（特願平 10 - 14747 号）が、さらに研究を進める中で、染色体 DNA に温度感受性変異遺伝子 *frr* を持つ大腸菌の温度感受性遺伝変異種は一定温度以上になると RRF が不活性化するので生育不可能となるが、他の菌からの RRF が大腸菌中で活性を有する場合には、その菌の *frr* を含む温度感受性株はその温度以上でも生育し得るという新たな知見を見出し、本発明を完成するに至った。

本発明者は、この大腸菌温度感受性遺伝子変異株を用いて、該遺伝子変異株の RRF が不活性化する温度以上の温度で各種細菌、具体的には緑膿菌及び後述する未確認の菌株 X の *frr* 遺伝子としてコードされている RRF の活性を確認し、これにより初めて緑膿菌及び菌株 X の RRF 及び *frr* を同定することができた。緑膿菌 *frr* 及び X *frr* の存在とそのコードしている RRF が大腸菌における *frr* 遺伝子変異を補い得る能力を有することを示したことにより、他の病原菌からも RRF 遺伝子を取り出すことが同様の方法で出来ることが明らかになった。加えて、緑膿菌 RRF 及び X RRF を純化して大腸菌リボソームと EFG とを合わせて用いたところ、インビトロにおける RRF 活性を示した。

このように純化した緑膿菌 RRF 及び X RRF を得る方法を示したことは、これらの RRF に対する阻害剤の開発に有益なばかりでなく、広く他の病原菌の RRF に対する阻害剤の開発にとって極めて有意義である。

即ち、本発明は、上記開発に有用な、染色体DNAに温度感受性変異遺伝子 *frr* を持つ大腸菌の温度感受性遺伝子変異株、各種細菌とくに緑膿菌及び菌株XのRRFをコードしている *frr* 遺伝子を組み込んだプラスミドを有する大腸菌の温度感受性遺伝子変異株、及びこれを用いて、該遺伝子変異株のRRFが不活性化する温度以上の温度で他の菌の *frr* 遺伝子としてコードされているRRFの活性を同定する方法に関する。また本発明は、各種細菌からのRRFをコードしている *frr* 遺伝子を含む断片を組み込んだベクタープラスミドを作成し、これを大腸菌の菌株に導入して他の菌からのRRFを高発現させる方法、及びこれを培養した後、菌を粉碎して抽出液を作成し、これをろ過してなる、各種細菌からのRRFの精製方法に関する。さらに本発明は、緑膿菌RRF、菌株X RRFの各アミノ酸配列及び緑膿菌 *frr*、菌株X *frr* の各塩基配列にも関する。

図面の簡単な説明

図1

緑膿菌RRFが大腸菌中で機能することを示すグラフである。

大腸菌温度感受性RRF遺伝子変異株(□, ■)、その親株(○, ●)、IPTG添加により誘導可能な緑膿菌RRFをコードする遺伝子を含むプラスミドを導入した大腸菌温度感受性RRF遺伝子変異株(△, ▲, +)の生育曲線を見た。細菌は各々43℃において、表に示した液体培地(グルコースの添加、不添加)中で培養した。縦軸には、可視光600nmで測定した吸光度を用いた。

図2

緑膿菌 *frr* 遺伝子座位の解析に係る。

A) は緑膿菌染色体遺伝子PAO1を制限酵素EcoRIで切断後パルスフィールド電気泳動した像であり、B) は A) の緑膿菌 *frr* によるサザンブロッティングである。

図3

緑膿菌RRFの大腸菌内での発現を示す図である。

各々得られた細胞抽出液5mgをドデシル硫酸ナトリウム添加ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて分離し、クーマシーブリリアントブルーR250により染色した。左から分子量マーカー、大腸菌DH5 α 、プラスミドpSP1814を導入した大

腸菌 DH5 α 、IPTG 存在下プラスミド pSP1814 を導入した大腸菌 DH5 α 、IPTG 非存在プラスミド pRR2 (大腸菌 *frr* 含む) を導入した大腸菌 DH5 α を用いた。

図 4

抗大腸菌 RRF ポリクローナル抗体の緑膿菌 RRF に対する反応性を示す図である。

まず、精製した緑膿菌 RRF を図 3 と同様に電気泳動して分離した。レーン 2 から 7 までは緑膿菌 RRF を 16 μ g から 0.5 μ g まで各々倍々希釈して用い、レーン 8 には大腸菌 RRF を 0.5 μ g 用いて、膜へ転写した後、20000 倍に希釈したウサギ抗大腸菌 RRF ポリクローナル抗体を一次抗体としてウエスタンブロッティング法を用いて検出した。

図 5 (A)、図 5 (B)

精製した大腸菌 RRF と緑膿菌 RRF の活性能を比較するグラフである。

図 5 (A) は、精製した緑膿菌 RRF を、図 5 (B) は精製した大腸菌 RRF を用いて、以下の反応を行なった結果を示している。

すなわち、10mM トリス (pH7.4)、80mM NH_4Cl 、8.2mM MgSO_4 、1mM Dithiothreitol、10mM ピューロマイシン、160mM GTP、8.0 O.D.260 ユニット ポリソーム、94 μ g S150 (RRF を含まない) を 275 μ l 中で混合し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間インキュベートした。この際、図に各々記されている量の緑膿菌、大腸菌 RRF を加えた。反応物は、5ml の 15% から 30% 濃度勾配のシュクロースに重層し、ベックマン社製 SW50.1 ローターを用いて 40,000rpm の超遠心を行なった。超遠心後、サンプルをイスコ社製分光高度計にて 254nm の紫外光における吸光度を連続的に測定してポリソームのプロファイルを見た。得られた結果から、ポリソームからモノソームへの解離を計算して図示した。

図 6

X RRF の大腸菌中における発現を示す図である。

菌株 X の RRF をコードする遺伝子を含むプラスミド pEB2 と、そのベクタープラスミド pBluescript (Stratagene 製) を大腸菌 DH5 α 株 (GIBCO BRL 製) に導入した。導入された菌株は 2 リットルの LB 液体培地で 37 $^{\circ}\text{C}$ 終夜培養し、そこから得た細菌を用いて全細胞抽出液を作製し、SDS-PAGE 電気泳動により分離

した。左から、分子量マーカー、精製大腸菌 RRF1mg、ベクター pBluescript を導入した大腸菌 DH5 α 株より得た細胞抽出液、pEB2 を導入した大腸菌 DH5 α より得た抽出液をサンプルとして流した。左に示す数字はそれぞれ分子量マーカーにより示された蛋白の分子量を、右に示す矢印は菌株 X の RRF の位置を示す。

図 7

X RRF と大腸菌 RRF との抗体による交叉反応を示す図である。

X RRF をコードする遺伝子を含むプラスミド PEB2 と大腸菌 RRF をコードする遺伝子を含むプラスミド pRR1 (Ichikawa and Kaji 1989, J. Biol. Chem. 264 : 20054 - 20059) をそれぞれ大腸菌 DH5 α 株に導入、発現させた後、本明細書中に記載された方法により各々の RRF を精製した。精製された X RRF をレーン 2 から 7 に倍々希釈して ($16 \mu\text{g}$ から $0.5 \mu\text{g}$) 用い、大腸菌 RRF ($0.5 \mu\text{g}$) をレーン 8 にポジティブコントロールとして用いて前述の SDS - PAGE 電気泳動で分離した後ニトロセルロース膜に転写した。転写された膜はウサギ抗大腸菌 RRF ポリクローナル抗体 (20000 倍に希釈して使用) を用いてウェスタンブロッティング法により検出を行なった。尚、レーン 1 には分子量マーカーを用いた。

図 8

X RRF による大腸菌由来のポリソームからのリボソーム遊離能を示すグラフである。

図 5 に示した方法と同様の方法で、精製 EF - G 及び精製 X RRF を用いて大腸菌由来ポリソームからのリボソーム遊離能を試験し、図示した。

発明の実施の形態

以下に、実験例を示すことにより本発明を具体的に説明する。なお、本明細書中においては、緑膿菌及び X の 2 種の菌株の RRF 及び frr についてのみ記載したが、他の病原菌についても同様に実施できることはいうまでもない。また実験例はあくまで本発明を具体的に説明することを目的とするものであり、他の方法を制限するものではない。

実験例 1 RRF を温度感受性にするために必要なアミノ酸の変化

RRF をコードする遺伝子に遺伝変異をもたらすために、この遺伝子 DNA をテンプレートとして Taq ポリメラーゼによる PCR を行った。このポリメラー

ぜは誤ったDNA複製を行う傾向があり、そのためにできあがったDNAは多くの遺伝変異を有することが知られている。この変異を含むRRF遺伝子を既にクロモソームのRRF遺伝子が不活化されている大腸菌にプラスミドとして与える。この大腸菌はクロモソーム上に遺伝子変異のため不活性化されたRRF遺伝子を有するため野生RRF遺伝子を含むプラスミドをあらかじめ保有し、生育はこのプラスミドに頼っている。次に遺伝変異を有するRRF遺伝子を含むプラスミドと野生タイプのRRF遺伝子を含むプラスミドを交換する作業を既述の方法で行なった（Janosiら, Proc. Natio. Acad. Sci, 91, 4249, 1994）。更にこのプラスミド上の変異遺伝子をクロモソーム上の不活化した遺伝子と交換することによって種々の変異株の作成に成功した。その結果を表1に示す。

実験例2 菌株Xからのfrr遺伝子の同定

本発明におけるXのRRFをコードしてるfrr遺伝子の同定は、Staphylococcus aureus（以下、黄色ブドウ球菌）のゲノムライブラリを、大腸菌温度感受性変異RRF遺伝子菌株においてその高温での発育を補い得るような遺伝子のスクリーニングを行なうためにプラスミドライブラリへ変換したことが基になっている。

即ち、lambda ZAP II vectorに組み込まれた黄色ブドウ球菌ゲノムライブラリRN450（ストラテジーン社、Stratagene Catalog # 936052）をExAssistヘルパーファージと共に大腸菌 XL1-Blue株に感染させて、フィラメントファージパーティクルを含むファジミドpBluescriptに変換させた。その結果得られたファージを、大腸菌LJ12株（大腸菌MC1061株を基に、染色体DNAに温度感受性変異遺伝子frr12を持つ菌株で、あらかじめ大腸菌SOLR株（ストラテジーン社）のF'因子を導入し、更にバクテリオファージラムダに対する耐性を持たせてある）に注入した。希釈菌株を、アンピシリンを100 μ g/ml含むLAプレートに一様に撒いて43℃（このLJ12株だけでは生育出来ない温度）で一晩培養した。その中で増殖し得た集落（コロニー）よりプラスミドDNAを精製し、大腸菌LJ14株（別の温度感受性RRF遺伝子変異株）へ注入した。この菌株におけるプラスミドの導入はアンピシリンにより確認し、32℃と43℃の二種の温度で培養した。両者の温度において、ほぼ同じ効率でその宿主大腸菌を発育させて得たプラスミドDNAを精製し、以下の方法により解析した。

先ず、得られたプラスミドDNAをEcoRI制限酵素で切断、自己環状形成をして約2.6K塩基からなるプラスミドpEco-2を得た。このpEco-2をBamHI制限酵素で切断、自己環状形成させたところ、約1K塩基からなるDNAを得て、pEB-3と名付けた。このpEB-3は32℃、43℃両者の菌株より得られた。このfrrは当初*S. aureus*由来のfrrと思われたが配列表1、2の配列はその後解明された*S. aureus*のfrrとは全く異なることから、市販のライブラリにコンタミとして含まれていた未知の細菌のDNA由来と考えられ、これをX RRFと呼ぶことにする。

なお、配列表2に対応する一文字表記のアミノ酸配列を以下に示す。

```
MINEIKKEAQERMGKTLEALGHAFKIRTGRAHPSILDSVMVSYYGADTPLRQVANVTV
EDSRTLALAVF
DKSMIQAWEKAIMTSDLGLNPATAGTTIRVPMALTEETRKGYTKQARAEAEQARVSVR
NIRRDALAKLK
DLQKEKEISEDEERRAGDDVQKLTDFIGIEIEKALEAKEADLMAV
```

ラショナルドラッグデザインに不可欠の三次元構造の決定にX RRFが極めて適合していることから、このX RRFの配列は産業上極めて重要である。

実験例3 緑膿菌からのfrr遺伝子の同定

本発明における緑膿菌frr遺伝子同定の方法は、緑膿菌コスミドゲノムライブラリの、温度感受性遺伝子変異RRFを持つ大腸菌への相補実験によるスクリーニングが基になっている。

緑膿菌PA01株の染色体DNAをSau3A制限酵素で切断し、0.7%アガロースゲル電気泳動により25kから30k塩基の断片を集め、定法(Marmurら1961, J. Mol. Biol. 3: 208-218)でコスミドゲノムライブラリを作成した。即ち、得られたDNA断片をコスミドベクタープラスミドpLA2917(Allenら, 1985 J. Bacteriol. 161: 955-962)のBglII制限酵素切断位に挿入、パッケージングをして大腸菌S17-1株(Simonら, 1983, Bio/Technology 1: 784-789)に導入した。導入された株は、その選択物質であるテトラサイクリンを30 µg/ml含むLB寒天培地上に撒かれ、2400の株が得られた。それぞれの菌株をLB液体培地で培養した後、テトラサイクリン(30 µg/ml)とストレプトマイシン(500 µg/ml)を含み大腸菌LJ14株(大腸菌MC1061株に温度感受性変異遺伝子frr14

を含むもの)が植えられたLB寒天培地上に撒いた。その撒かれた菌株は、pLA2917を含んでいるためにテトラサイクリンに耐性であるが、ストレプトマイシンには感受性である。一方、被感染細胞となる大腸菌LJ14株はストレプトマイシンに耐性であるがテトラサイクリンに感受性であり、又42℃では発育しえない。このプレートを42℃で16から20時間培養後、発育の認められた集落をすべて回収した。そこに存在するプラスミドよりRNAを定法により回収し配列を決定した。その結果を配列表3、4に示す。

なお、配列表4に対応する一文字表記のアミノ酸配列を以下に示す。

MINEIKKDAKERMQKSVESLSHNFGRI RTGQAHPSILEGVMVPYYGADTPIKQVANITVK
DARTLQVVA
ERNMLGAVDKAIGSAGLN LNPTNLGELLISMPALTEETRRGFTKQARDVAEDARVAV
RNIRRDANSSLK
DLVKEKEISEDEERRATGEIDDLTKKFVAEIDAKLAEKEKDLMAV

上記の通り、大腸菌温度感受性遺伝子変異株を用いてX及び緑膿菌のRRFを単離することが可能であり、この事実を用いてX及び緑膿菌RRFを分離同定できる。本発明の広範な意義としてXと緑膿菌のfrrの単離に示されたように、本明細書に示された温度感受性RRF遺伝変異種を用いることにより他の菌種のRRFをコードする遺伝子を同定することも可能である。即ち、そのようにして得られた遺伝子も本発明に含まれるものとする。

実験例4 大腸菌内における緑膿菌RRFの機能確認

上記実験例にて得られた緑膿菌frrが真に緑膿菌のRRFをコードしていることを確認するために以下に示す実験を行なった。

即ち、その得られたオープンリーディングフレーム(ORF)の開始コドンより上流15塩基から始まり、終始コドンより下流507塩基を含むDNAをプラスミドpMW118に組み込んだプラスミドpM02925を、その染色体上に温度感受性frr遺伝子変異とlacIq遺伝子を持つ大腸菌LJ2221株に注入し、緑膿菌のRRFにより大腸菌の染色体上の温度感受性RRFを補えるか否かを見る実験を行った。このプラスミド(pM02925)はlacプロモーターを有する。図1に示すように、大腸菌LJ2221株の親株に相当する大腸菌MC1061株は温度耐性であり、大腸菌

LJ2221株はRRFが温度感受性のため温度感受性である。プラスミドpMO2925を持つ大腸菌LJ2221株は、IPTG非存在下では43℃において発育が阻害されたのに対し、1mMのIPTG添加条件下では発育し得た。即ち、緑膿菌のRRFのORFとして得られた遺伝子の転写産物が、大腸菌株の中で機能し得ることが確認された。

実験例5 パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）とサザンブロッティングによる緑膿菌frr遺伝子座位の解析

上記実験例にて得られた緑膿菌frr遺伝子が、緑膿菌クロモソーム上のどの位置に存在しているかを調べるために次の実験を行った。

まず、緑膿菌染色体遺伝子PAO1を制限酵素EcoRIで切断し、パルスフィールド電気泳動を行った後、制限酵素KpnI - EcoRVで切断した緑膿菌frrを含む断片を用いてハイブリダイズした。その結果単一の6.3K塩基からなるバンドが検出され、このfrr遺伝子がこの緑膿菌DNAバンド上に存在していることが示された。更に、制限酵素SpeIで切断した染色体DNA断片をPFGEで分離した後、制限酵素KpnI - EcoRVで切断した1.4K塩基からなる緑膿菌frrを含む断片をプローブとしてサザンブロッティングを行った。

図2に示す通り、制限酵素SpeIで切断した際の断片でSpTと新たに名付けた120K塩基の断片が検出され、そこにはrpdB、tsf、pyrH、frrの四つの遺伝子がコードされていることがわかった。このSpTは緑膿菌染色体上の30分から32分の位置に存在し、自己拮養合成遺伝子の多くある領域（auxotroph-rich region）も含まれていることが分った。

実験例6 大腸菌内での緑膿菌RRFの大量発現の確認

上記緑膿菌frrによりコードされている緑膿菌RRFが大腸菌内で発現する系を開発し、緑膿菌RRFに対するラショナルドラッグデザインをするに当たって必要な蛋白質を得ることに成功した。

即ち、KpnI/EcoRV切断による1.4K塩基の緑膿菌frrを含む断片をプラスミドpUC18とpUC19のKpnI/HincII位に挿入してそれぞれプラスミドpSP1814、pSP1914を作成し、これを大腸菌DH5α株に導入した。

図3に示すように、プラスミドpSP1814を導入された菌株においてはIPTGに

よる誘導を行なわなくても大腸菌RRFをコードする遺伝子を含むpRR2 (Shimizu and Kaji 1991, J. Bacteriol. 173:5181-5187; Ichikawa and Kaji 1989, J. Biol. Chem. 264:20054-20059)を導入した菌株と同様に非常に高発現の緑膿菌RRFが認められた。大腸菌DH5 α 株はlac Iq保持株では無いため、このようにlacプロモーターによるfrr遺伝子発現のが常に行われている。図3に示すように、緑膿菌のRRFは大腸菌のそれよりやや早く泳動し、高発現であるが故にこの緑膿菌のRRFを次に示す方法により精製することに成功した。

実験例7 リコンビナント緑膿菌RRFの純化とインビトロにおけるその活性確認

以下に記載する方法によりリコンビナント緑膿菌を精製した。

まず、大腸菌DH5 α にプラスミドpSP1814を導入した菌株を培養後、アルミナを用いて菌を粉砕し抽出液を作製した。更にこの抽出液を30,000Gおよび150,000Gの超遠心を行い上澄を得た後、45%から70%の硫酸アンモニウム沈澱を行った。続いて、10mM Tris-Cl (pH7.8), 20mM NH_4Cl , 1mM MgSO_4 , 6mM β MEで平衡化したDEAEセルロースカラム (サンプルもこの溶液に透析しておく)を行ない、RRFの存在しているフロースルーを集めた。次に10mM Tris-Cl (pH7.6), 50mM NH_4Cl , 10mM MgSO_4 , 0.5mM DTTで平衡化したセファデックスG-100カラムによるゲル濾過を行った。この際RRFは通常2本目のピークに存在しているため、そのフラクションを集め、次のカルボキシルメチル (CM) -セルロースカラムによる精製を順次行った。CM-セルロースカラムは予め10mM $\text{KAc}-\text{CH}_3\text{COOH}$ (pH5.0), 20mM NH_4Cl , 0.5mM DTT, 5%グリセロールで平衡化しておき、160mlの0.02規定から0.62規定のアンモニウムクロライドのグラジエントを用いて流出させた。ポリアクリルアミド電気泳動にて、RRFの存在が確認され、かつ他の蛋白の存在が認められないフラクションのみを集めて、10mM Tris-Cl (pH7.6), 50mM NH_4Cl , 10mM MgSO_4 , 0.5mM DTTに透析をして精製RRFとした。また、各ステップにおけるRRFはポリアクリルアミドゲル電気泳動にてその純度を調べた。

かくして得られた緑膿菌RRFは図4に示す通り、大腸菌RRFに対する抗体を用いたところ、同等の反応を得るには30倍の差があったものの、純化した緑膿菌RRFは大腸菌RRFに対するポリクローナル抗体と反応した。共通するアミノ酸が

64 %、similarity が 77 % であることから考えても、この反応における 30 倍の差も理解しうる。緑膿菌 RRF は図 1 にあるデータに示されたとおり、大腸菌中において機能することからも予想出来るように、大腸菌のポリソームを用いたインビトロ実験でリボソーム解離能が認められた (図 5)。その活性は、大腸菌 RRF の活性ほどは認められなかったが十分有意である。

この発見は緑膿菌 RRF に特異的なドラッグデザインを行う際に、阻害剤の活性測定法として極めて重要である。

実験例 8 X RRF の大腸菌内での発現確認

図 6 は、菌株 XRRF をコードする遺伝子の大腸菌株内での発現を見た結果を示したものである。図に示すように、大腸菌から精製した RRF と、前述の X RRF をコードする遺伝子を含むプラスミドを導入した大腸菌株 (DH5 α) から得た全細胞抽出液、そのベクタープラスミドだけを導入した大腸菌株から得た全細胞抽出液を各々、電気泳動にかけて観察した。X RRF をコードする遺伝子を含むプラスミドを導入した大腸菌株から得られた抽出液中には、大腸菌 RRF よりやや泳動速度の早い X RRF のバンドが認められた。一方、この X RRF をコードする遺伝子を抜いたプラスミドを導入した大腸菌株から得られた抽出液中には X RRF のバンドは全く認められなかった。即ち、大腸菌 DH5 α 株中において、X RRF の高濃度の発現が認められた。

これは X RRF の三次元構造を解明し、それを基盤として RRF に対するラショナルドラッグデザインをする上で極めて重要な発見で産業上の意義は大きい。

実験例 9 X RRF が大腸菌 RRF の抗体に対する反応

ウサギに大腸菌 RRF を免疫して得た抗大腸菌 RRF ポリクローナル抗体を用いて X RRF に対する反応の試験を行なった結果を図 7 に示す。純化した X RRF を電気泳動し、ニトロセルロース膜へ転写後、ウサギ抗大腸菌 RRF ポリクローナル抗体を一次抗体として用いて検出した。図に示すレーン 2 から 7 には純化した X RRF を倍々希釈したものを抗原として用い、レーン 8 には大腸菌 RRF をコードする遺伝子を含むプラスミド pRR1 を導入した大腸菌株より分離精製した大腸菌 RRF を用いた。

予測されたように、精製した大腸菌 RRF への反応が認められ、高濃度の精製 X

RRFには反応した。即ち、大腸菌 RRF に対するウサギポリクローナル抗体の、X RRF への交叉反応は低いながら認められた。

実験例 10 精製 X RRF のインビトロにおける活性確認

インビトロにおける RRF の生物学的活性はポリソームからモノソームへのリボソームの解離を見る実験により検出した (Hirashima and Kaji 1972, Biochemistry 11: 4037 - 4044)。そこで大腸菌から分離精製したポリソームを用いて、精製した X RRF と大腸菌 RRF によるリボソーム解離能を調べた結果を図 8 に示す。

同図に示す通り、精製した X RRF の濃度に依存して、リボソームの解離が上昇する。このことから、X RRF が、大腸菌ポリソームにおける mRNA からのリボソーム解離を保持していることが分かり、故に、以下に示す実験で大腸菌温度感受性 RRF 遺伝子変異株において X RRF による相補が行なわれたことが理解される。

このインビトロにおいて X RRF のアッセイが可能であるという発見は、X RRF に対してラショナルドラッグデザインにより阻害剤を創造するに当り極めて有意義である。

実験例 11 大腸菌中における X RRF の機能確認

大腸菌株において X 由来の RRF が機能し得ることを示すために、表 2 に示す実験を行なった。

X RRF をコードする遺伝子を含むプラスミドを導入した大腸菌 (温度感受性 RRF を含む) が 42°C で増殖し得たことは、X RRF が大腸菌中で機能することを示す。X RRF をコードする遺伝子を欠く陰性コントロールベクタープラスミドを導入した菌株は 42°C で増殖せず、また、各々の宿主細胞への形質導入効率は野生型への導入効率とほぼ同じであった。このプラスミド由来の RRF に依存して細菌の発育を試みる実験は、以下に示すように 2 つのインコンパチブルなプラスミドを用いて行われた。染色体上の RRF をコードする遺伝子 *frr* のフレームシフトによる変異を伴う大腸菌株、LJ3 に於いて、野生型 *frr* 遺伝子を含むプラスミドはこの大腸菌の発育に欠かせない。この LJ3 中において、同様に X RRF が働き得るかを調べた実験結果を表 3 に示す。

即ち、大腸菌野生型 *frr* 遺伝子を含む pPEN1054 プラスミドの存在下で生育している LJ3 に、X RRF をコードする遺伝子 pEB-2 を含むプラスミドを導入し、予め導入されていたプラスミド pPEN1054 をプラスミドインコンパチビリティの原理に基づき追い出して、X 由来の RRF を利用して LJ3 が発育し得るかを見た。プラスミド pPEN1054 にはテトラサイクリン耐性遺伝子を、pEB-2 を含むプラスミドとその陰性対照のベクタープラスミド、陽性対照の pRR1 を含むプラスミドはアンピシリン耐性遺伝子を併せて持ち、アンピシリンを含む LB 寒天培地上での植え継ぎを繰り返すことにより、それら新たに導入されたプラスミドの存在を確認した。その結果、pEB-2 によりコードされた X RRF は LJ3 の中で発現し、野生型大腸菌 RRF に代って機能することが示された。また、ポジティブコントロールである pRR1 を導入したプラスミドは期待通り pPEN1054 の代りに大腸菌内で機能することが示された。

この事実は種々の細菌由来の *frr* をクローン化する簡便法を示すもので、各種細菌 RRF に特異的な阻害剤を探索する上で極めて重要な発見である。

産業上の利用の可能性

本発明は、各種の病原菌から RRF 遺伝子を取り出し、同定する手法を提供するものであるが、本発明によって得られる RRF 遺伝子の同定等による情報は、RRF をターゲットとした抗菌剤をラショナルドラッグデザインを用いて創製するためには不可欠なものであることから、次世代抗菌剤を開発する上で極めて重要な産業上の意義を有する。

表1 RRF を温度感受性にするアミノ酸変異株

遺伝変異		変異の種類	分離された 変異株の数	遺伝変異 株の名
核酸配列変異	アミノ酸配列変異			
T(2)→C	Met1→Ala	N-terminal truncation	2	frr8
A(62)→G	Lys21→Arg	-----	1	frr15
T(350)→A	Val117→Asp	-----	2	frr14
T(383)→G	Val128→Gly	-----	1	frr2
T(443)→C	Ile148→Thr	-----	1	frr6
T(479)→A	Val160→Glu	-----	1	frr7
T(488)→C	Leu163→Pro	-----	3*	frr4
T(488)→C & G(475)→A	Leu163→Pro & Asp159→Asn	double point mutation	1	frr10
G(535)→deletion	Glu179→Lys Glu181→Asn Leu182→Stop	frameshift mutation & C-terminal truncation	1	frr16
G(541)→T	Glu181→Stop	C-terminal truncation. Also carries T(279)→A silent mutation	1	frr13
T(545)→C	Leu182→Pro	-----	3	frr17
T(545)→C & C(26)→T	Leu182→Pro & Ala9→Val	double point mutation	1	frr3

* この遺伝変異株の 一つは開始コドンとリボソーム結合部位の間の 5 の位置の A が無いものであった。

表 2

温度感受性frr変異遺伝子を持つ大腸菌中における菌株X RRFの機能を見る実験例
 Allele independent complementation of the temperature sensitive phenotype of *E. coli* frr mutants by X RRF clone

形質転換 プラスミド	受容体中の frrアレル	50 μ gのDNAからの 形質転換細胞の数		形質導入効率*
		32°C	43°C	
pEB-2 (X RRFクローン)	野生型	8.7×10^4	4.6×10^4	0.5
	frr13	1.7×10^5	5.4×10^4	0.3
	frr14	3.7×10^5	8.4×10^4	0.2
pBluescript (X RRFクローン のベクター)	野生型	1.4×10^5	1.1×10^5	0.8
	frr13	2.3×10^5	< 5	< 2.2×10^{-5}
	frr14	4.7×10^5	< 5	< 1.1×10^{-5}

*形質導入効率：43°Cにおける形質転換細胞の数を32°Cにおける形質転換細胞の数で除した値

表 3
フレームシフト変異 *frr* 遺伝子を持つ大腸菌中における X RRF の機能を見る実験例

ColEIレプリコン を有する形質転換 プラスミド	選 択	試験された形質 転換体の数	ColEIを有し、野生型 <i>frr</i> が導入された pPEN1054 プラスミドを失った LJ3 (クロモソーム中の <i>frr1</i>) 形質転換細胞のパーセント
pEB-2 (X RRF クローン)	pEB-2	48	97.9
pBluescript (X RRF クローン のベクター)	pBluescript	16	0.0
pRR1 大腸菌 RRF のクローン	pRR1	16	100.0

*コロニーを 6 回集積した後、テトラサイクリンの存在下で形質転換細胞を
数えた (プラスミド pPEN1054 の選択マーカー)。

配列の数 : 4

配列番号 : 1

配列の長さ : 558

配列の型 : 核酸

配列 :

ATGATCAACGAGATCAAGAAGGAAGCGCAGGAGCGCATGGGCAAGACCCTGGAAG
CGCTGGGCCATGCCT
TCGCGAAGATTTCGTACCGGTCGCGCGCATCCGAGCATCCTGGATAGCGTGATGGTTT
CCTATTACGGGGC
CGATACGCCGCTGCGCCAGGTCGCCAACGTCACCGTGGAAGACTCCCGTACCCTGG
CCCTGGCCGTGTTC
GACAAGAGCATGATCCAGGCGGTCGAGAAGGCCATCATGACCTCCGACCTGGGGCT
CAACCCGGCCACCG
CCGGCACCAACCATCCGCGTACCGATGCCGGCCCTGACCGAGGAGACCCGCAAGGGC
TACACCAAGCAGGC
GCGTGCCGAGGCCGAGCAGGCGCGGGTTTCCGTGCGCAACATCCGTGCGGATGCGC
TGGCCCAAGTTGAAG
GACCTGCAGAAGGAAAAGGAAATCAGCGAGGACGAAGAGCGCCGCGCCGGCGACG
ACGTGCAGAAGCTGA
CCGACAAGTTCATCGGTGAGATCGAGAAGGCACTGGAAGCCAAAGAAGCGGACCTC
ATGGCTGTCTGA

配列番号 : 2

配列の長さ : 185

配列の型 : アミノ酸

配列 :

Met Ile Asn Glu Ile Lys Lys Glu Ala Gln Glu Arg Met Gly Lys
Thr Leu Glu Ala Leu Gly His Ala Phe Ala Lys Ile Arg Thr Gly
Arg Ala His Pro Ser Ile Leu Asp Ser Val Met Val Ser Tyr Tyr
Gly Ala Asp Thr Pro Leu Arg Gln Val Ala Asn Val Thr Val
Glu Asp Ser Arg Thr Leu Ala Leu Ala Val Phe
Asp Lys Ser Met Ile Gln Ala Val Glu Lys Ala Ile Met Thr Ser
Asp Leu Gly Leu Asn Pro Ala Thr Ala Gly Thr Thr Ile Arg Val
Pro Met Pro Ala Leu Thr Glu Glu Thr Arg Lys Gly Tyr Thr Lys
Gln Ala Arg Ala Glu Ala Glu Gln Ala Arg Val Ser Val Arg
Asn Ile Arg Arg Asp Ala Leu Ala Gln Leu Lys
Asp Leu Gln Lys Glu Lys Glu Ile Ser Glu Asp Glu Glu Arg Arg
Ala Gly Asp Asp Val Gln Lys Leu Thr Asp Lys Phe Ile Gly Glu
Ile Glu Lys Ala Leu Glu Ala Lys Glu Ala Asp Leu Met Ala Val

配列番号 : 3

配列の長さ : 558

配列の型 : 核酸

配列 :

```
ATGATCAACGAAATCAAGAAAGACGCCAAAGAGCGCATGCAGAAGTCGGTGGAATC
GCTGTCCCACAACT
TCGGTCGCATCCGTACCGGTCAGGCGCACCCAAGCATCCTGGAAGGTGTGATGGTGC
CGTACTACGGCGC
TGACACTCCGATCAAGCAAGTGGCCAACATCACTGTCAAAGACGCCCGTACCCTGC
AAGTCGTTGCGTTC
GAACGCAACATGCTGGGTGCCGTCGACAAAGCGATCGGCAGTGCAGGCCTGAACCT
GAACCCGACCAACC
TCGGTGAGTTGCTGCTCATCAGTATGCCGGCCCTGACCGAAGAAACCCGTCGTGGCT
TCACCAAGCAAGC
GCGTGACGTTGCTGAAGACGCGCGTGTGCGGTGCGCAACATTCGTCTGTGACGCGAA
CAGCTCGCTGAAG
GACCTGGTCAAGGAAAAAGAGATCAGTGAAGACGAAGAGCGTCGCGCGACTGGCG
AGATCGACGATCTGA
CCAAGAAATTCGTGGCTGAAATCGACGCGAAGCTGGCAGAGAAAGAAAAAGACCTG
ATGCCCCGTATAA
```

配列番号 : 4

配列の長さ : 185

配列の型 : アミノ酸

配列 :

Met Ile Asn Glu Ile Lys Lys Asp Ala Lys Glu Arg Met Gln Lys
Ser Val Glu Ser Leu Ser His Asn Phe Gly Arg Ile Arg Thr Gly
Gln Ala His Pro Ser Ile Leu Glu Gly Val Met Val Pro Tyr Tyr
Gly Ala Asp Thr Pro Ile Lys Gln Val Ala Asn Ile Thr Val Lys
Asp Ala Arg Thr Leu Gln Val Val Ala Phe
Glu Arg Asn Met Leu Gly Ala Val Asp Lys Ala Ile Gly Ser Ala
Gly Leu Asn Leu Asn Pro Thr Asn Leu Gly Glu Leu Leu Leu
Ile Ser Met Pro Ala Leu Thr Glu Glu Thr Arg Arg Gly Phe Thr
Lys Gln Ala Arg Asp Val Ala Glu Asp Ala Arg Val Ala Val Arg
Asn Ile Arg Arg Asp Ala Asn Ser Ser Leu Lys
Asp Leu Val Lys Glu Lys Glu Ile Ser Glu Asp Glu Glu Arg Arg
Ala Thr Gly Glu Ile Asp Asp Leu Thr Lys Lys Phe Val Ala Glu
Ile Asp Ala Lys Leu Ala Glu Lys Glu Lys Asp Leu Met Ala Val

請求の範囲

1. 染色体DNAに温度感受性変異遺伝子 *frr* を持つ大腸菌の温度感受性遺伝子変異株。
2. 他の菌からのRRFをコードしている *f r r* 遺伝子を組み込んだプラスミドを有する大腸菌の温度感受性遺伝子変異株。
3. 他の菌からのRRFをコードしている *frr* 遺伝子を組み込んだプラスミドを有する大腸菌の温度感受性遺伝子変異株を用いて、該遺伝子変異株のRRFが不活性化する温度以上の温度で他の菌の *frr* 遺伝子としてコードされているRRFの活性を同定する方法。
4. 43° Cの温度で同定することを特徴とする、請求項3に記載の方法。
5. 他の菌からのRRFをコードしている *frr* 遺伝子を含む断片を組み込んだベクタープラスミドを作成し、これを大腸菌の菌株に導入して他の菌からのRRFを高発現させる方法。
6. 他の菌からのRRFをコードしている *frr* 遺伝子を含む断片を組み込んだベクタープラスミドを作成し、これを大腸菌の菌株に導入し、培養した後、菌を粉砕して抽出液を作成し、ろ過してなる、RRFの精製方法。
7. 他の菌が緑膿菌である、請求項6に記載の方法。
8. 他の菌が未確認菌株Xである、請求項6に記載の方法。
9. 請求項7に記載の方法によって得られた緑膿菌RRF。
10. 下記の塩基配列を有する緑膿菌 *frr*。

ATGATCAACGAGATCAAGAAGGAAGCGCAGGAGCGCATGGGCAAGACCCCTGGAAG
 CGCTGGGCCATGCCT
 TCGCGAAGATTTCGTACCGGTCCGCCGCATCCGAGCATCCTGGATAGCGTGATGGTTT
 CCTATTACGGGGC
 CGATACGCCGCTGCGCCAGGTCCCAACGTCACCGTGGAAGACTCCCGTACCCTGG
 CCCTGGCCGTGTTT
 GACAAGAGCATGATCCAGGCGGTGAGAAGGCCATCATGACCTCCGACCTGGGGCT
 CAACCCGGCCACCG
 CCGGCACCAACATCCGCGTACCGATGCCGGCCCTGACCGAGGAGACCCGCAAGGGC
 TACACCAAGCAGGC
 GCGTGCCGAGGCCGAGCAGGCGCGGGTTTCCGTGCGCAACATCCGTGCGGATGCGC
 TGGCCAGTTGAAG
 GACCTGCAGAAGGAAAAGGAAATCAGCGAGGACGAAGAGCGCCGCGCCGGCGACG
 ACGTGCAGAAGCTGA
 CCGACAAGTTCATCGGTGAGATCGAGAAGGCACTGGAAGCCAAAGAAGCGGACCTC
 ATGGCTGTCTGA

- 1 1. 下記のアミノ酸配列を有する緑膿菌 RRF。

MNEIKKEAQERMGKTLEALGHAFKIRTGRAHPSILDSVMVSYYGADTPLRQVANVTV
 EDSRTLALAVF
 DKSMIQAVEKAIMTSDLGLNPATAGTTIRVMPALTEETRKGYTKQARAEAEQARVSVR
 NIRRDALAKL
 DLQKEKEISEDEERRAGDDVQKLTDFIGEIEKALEAKEADLMAV

- 1 2. 請求項 8 に記載の方法によって得られた X RRF。

- 1 3. 下記の塩基配列を有する X frr。

ATGATCAACGAAATCAAGAAAGACGCCAAAGAGCGCATGCAGAAGTCGGTGGAATC
 GCTGTCCCACAACT
 TCGGTGCGATCCGTACCGGTCAGGCGCACCCAAGCATCCTGGAAGGTGTGATGGTGC
 CGTACTACGGCGC
 TGACACTCCGATCAAGCAAGTGGCCAACATCACTGTCAAAGACGCCCCGTACCCTGC
 AAGTCGTTGCGTTC
 GAACGCAACATGCTGGGTGCCGTGACAAAGCGATCGGCAGTGCAGGCCTGAACCT
 GAACCCGACCAACC
 TCGGTGAGTTGCTGCTCATCAGTATGCCGGCCCTGACCGAAGAAACCCGTCGTGGCT
 TCACCAAGCAAGC
 GCGTGACGTTGCTGAAGACGCGCGTGTGCGGTGCGCAACATTCGTGCTGACGCGAA
 CAGCTCGCTGAAG
 GACCTGGTCAAGGAAAAAGAGATCAGTGAAGACGAAGAGCGTCGCGCGACTGGCG
 AGATCGACGATCTGA
 CCAAGAAATTCGTGGCTGAAATCGACCGGAAGCTGGCAGAGAAAGAAAAAGACCTG
 ATGGCCGTATAA

14. 下記のアミノ酸配列を有する X RFF。

MINEIKKDAKERMQKSVESLSHNFGRI RTGQAHPSILEGVMVPYYGADTPIKQVANITVK
DARTLQVVAF
ERNMLGAVDKAIGSAGLN LNPTNLGELLISMPALTEETRRGFTKQARDVAEDARVAV
RNIRRDANSSLK
DLVKEKEISEDEERRATGEIDDLTKKFVAEIDAKLAEKEKDLMAV

図 1

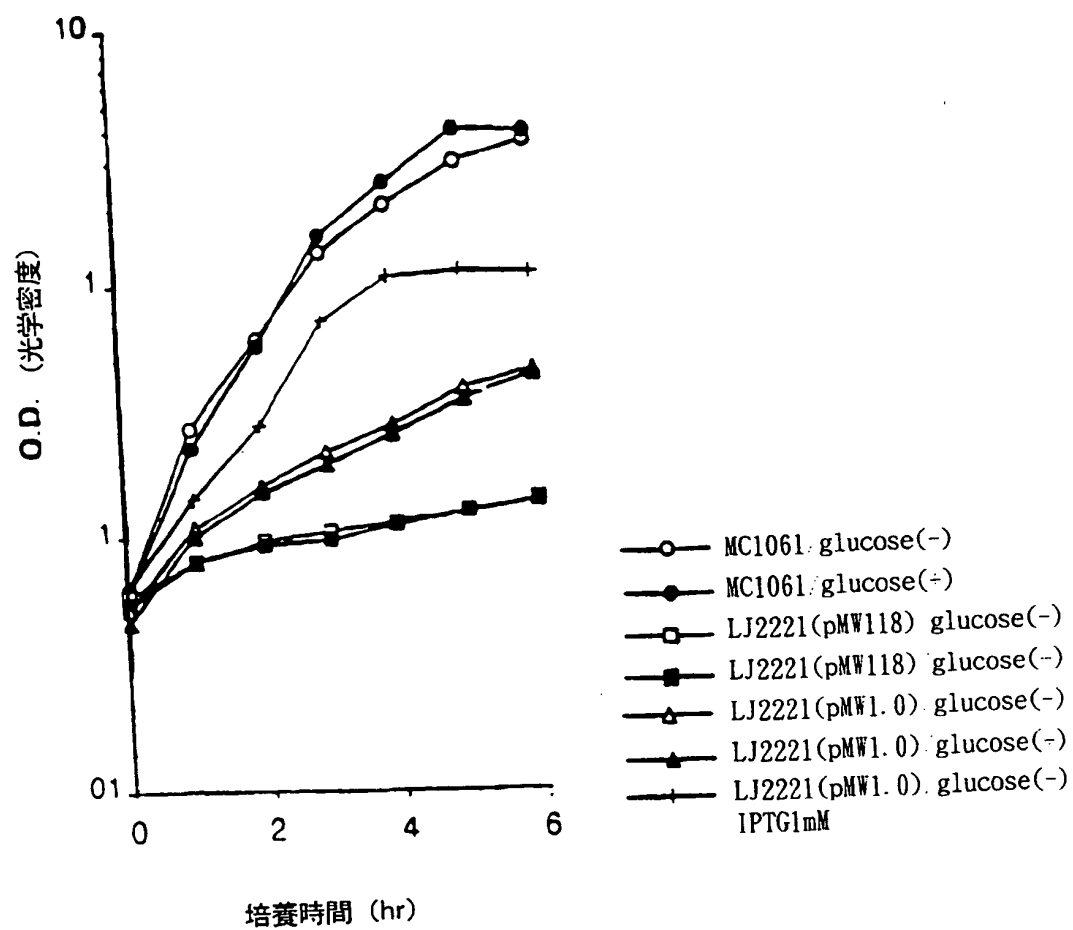
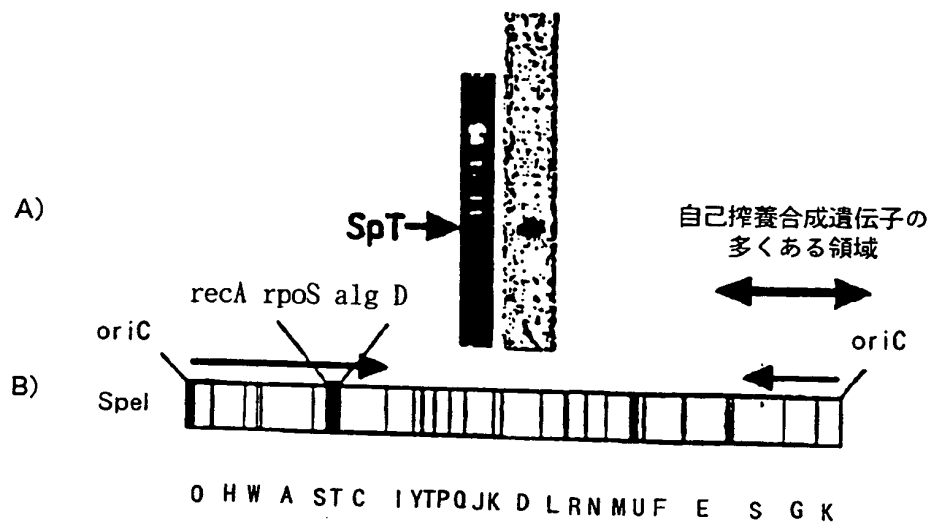


図 2



☒ 3

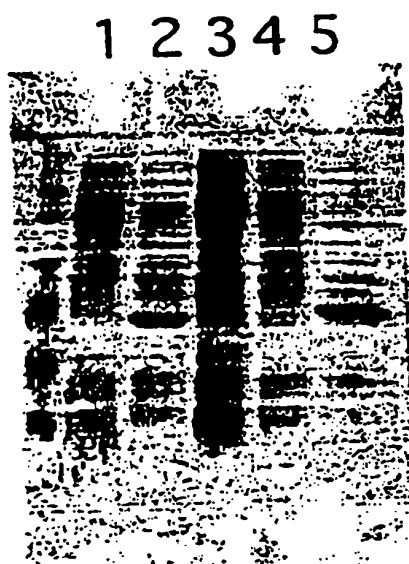


図 4

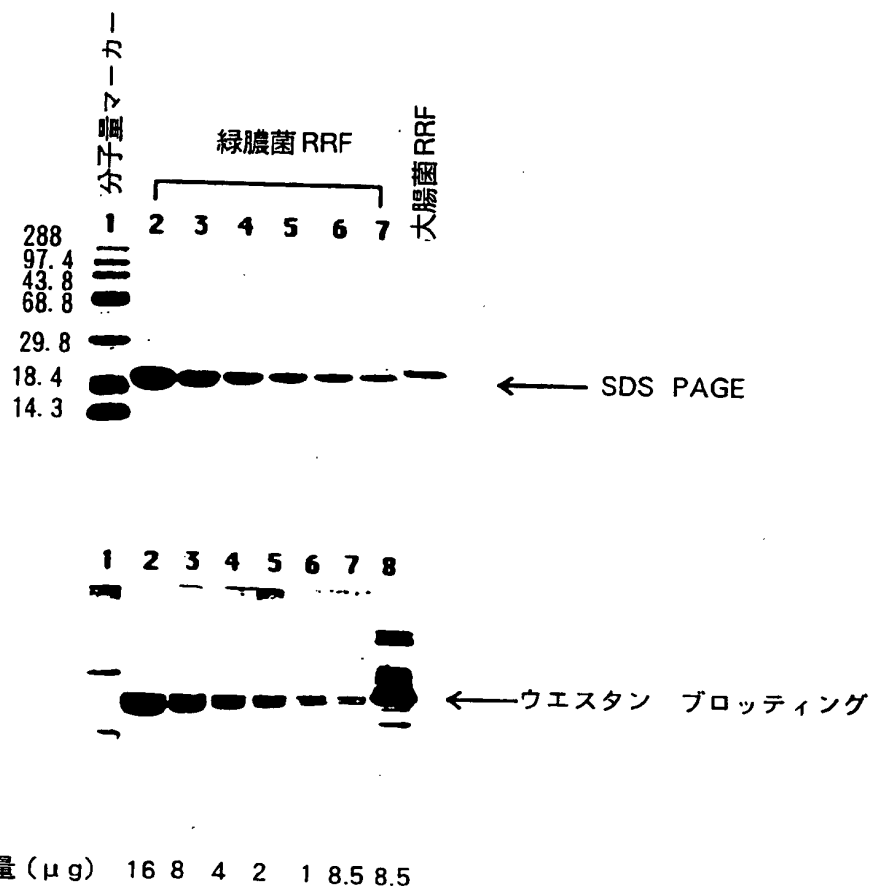
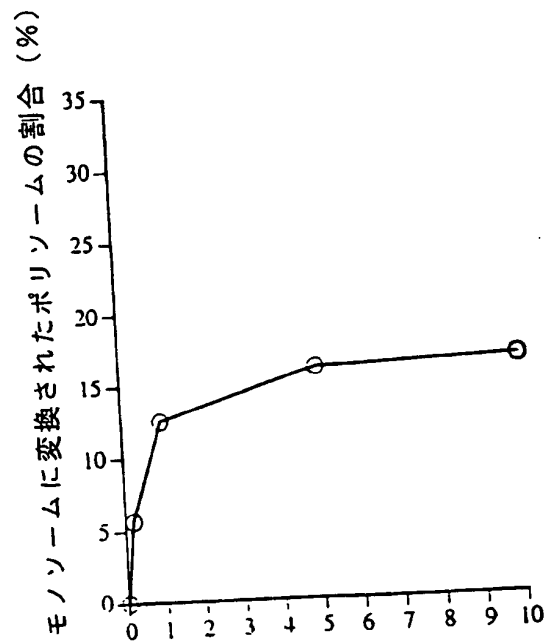
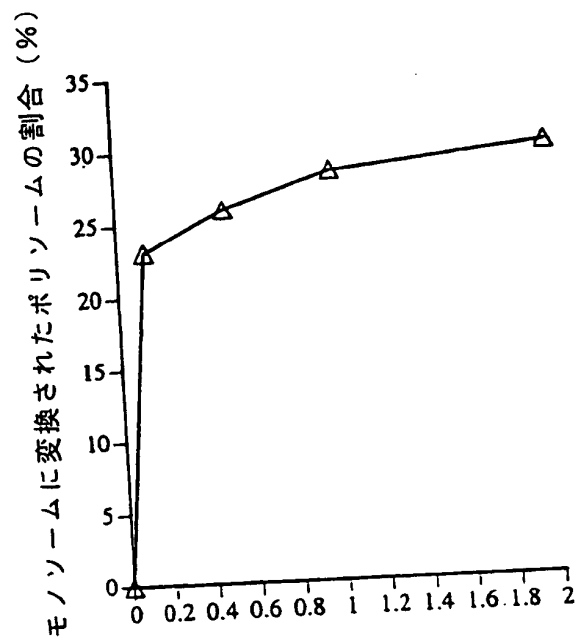


図 5 (A)



緑藻菌 RRF 濃度 (μg)

図 5 (B)



大腸菌 RRF 濃度 (μg)

図 6

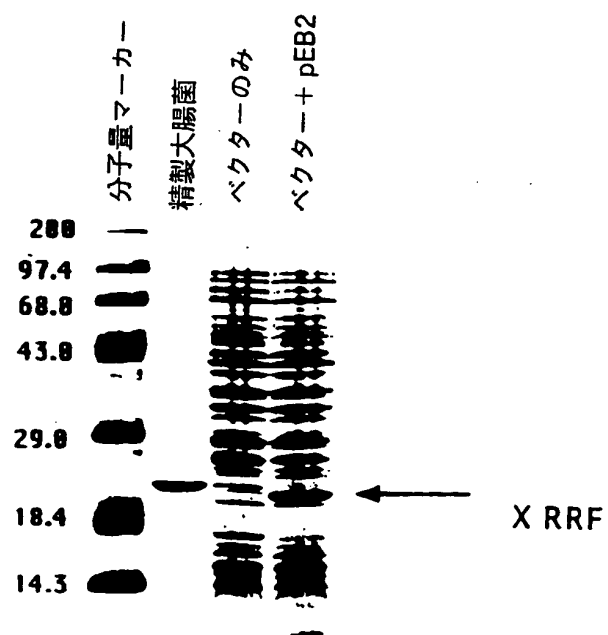


図 7

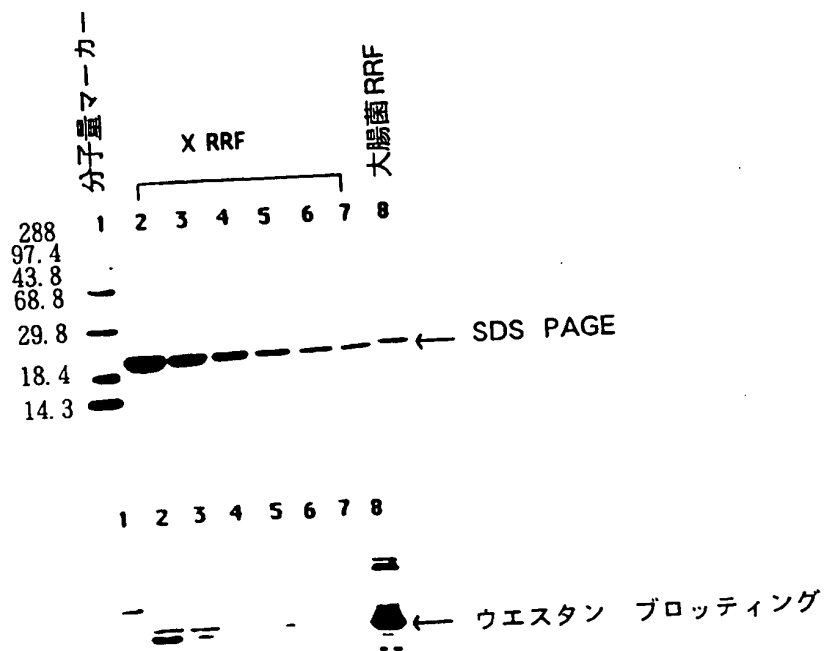
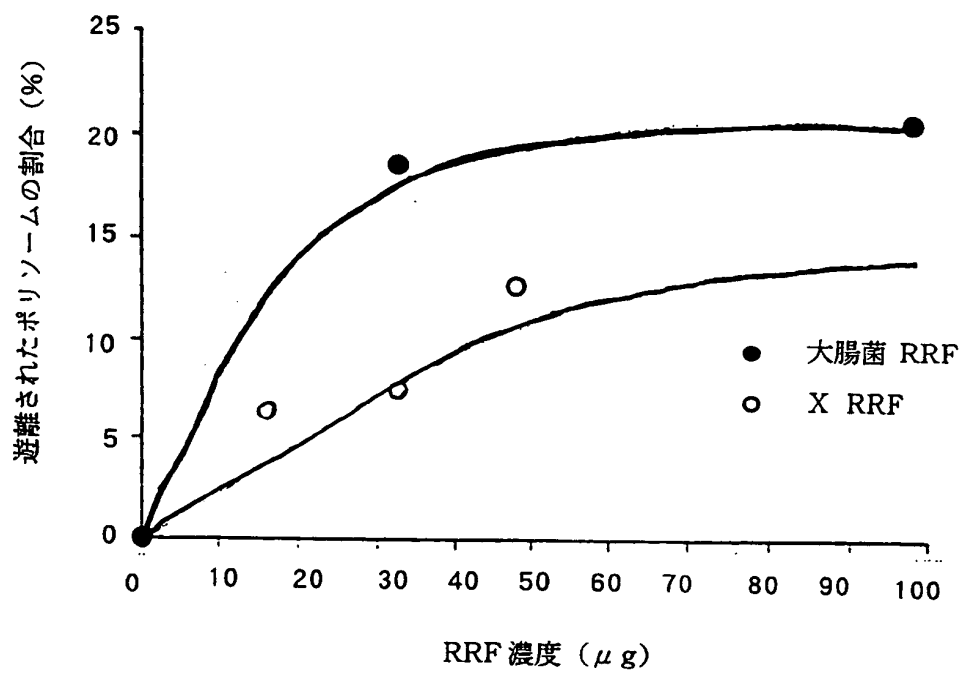


図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/00734

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/31, C12N1/20, C12N1/21, C12P21/02 // (C12N15/31, C12R1:385), (C12N15/31, C12R1:01), (C12N1/20, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/31, C12N1/20, C12N1/21, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DERWENT), WPI (DERWENT), GenBank/EMBL (geneseq)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 3-200797, A (Akira Kaji), September 2, 1991 (02. 09. 91) (Family: none)	1-14
A	J. Biol. Chem., Vol. 264, No. 33 (1989) Shinichi Ichikawa et al., "Molecular Cloning and Expression of Ribosome Releasing Factor", p.20054-20059	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
May 27, 1998 (27. 05. 98)

Date of mailing of the international search report
June 2, 1998 (02. 06. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/31, C12N1/20, C12N1/21, C12P21/02// (C12N15/31, C12R1:385), (C12N15/31, C12R1:01), (C12N1/20, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N15/31, C12N1/20, C12N1/21, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DERWENT), WPI(DERWENT), GenBank/EMBL(geneseq)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 3-200797, A (梶昭) 2.9月. 1991 (02.09.91) (ファミリーなし)	1-14
A	J. Biol. Chem., Vol. 264, No. 33(1989) Shinichi Ichikawa et al.; "Molecular Cloning and Expression of Ribosome Releasing Factor", p. 20054-20059	1-14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.05.98

国際調査報告の発送日

02.06.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4 B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3449